



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K 7/06, 5/08, 5/10, A61K 38/04	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/18235 (43) Date de publication internationale: 22 mai 1997 (22.05.97)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/01811</p> <p>(22) Date de dépôt international: 15 novembre 1996 (15.11.96)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 95/13543 15 novembre 1995 (15.11.95) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SOCIÉTÉ D'ÉTUDE ET DE RECHERCHE DE PATHOLOGIE APPLIQUÉE - SERPA [FR/FR]; Villa Missouri - Tech Village 2, 18, avenue de l'Europe, F-31520 Ramonville-Saint-Agne (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): DUSSOURD D'HINTERLAND, Lucien [FR/FR]; 10, rue Pierre-Benoît, F-31400 Toulouse (FR). PINEL, Anne-Marie [FR/FR]; 771, rue des Navigateurs, F-34280 La Grande-Motte (FR).</p> <p>(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>
<p>(54) Title: PEPTIDE CONJUGATES, USE THEREOF AS A DRUG, AND COMPOSITIONS CONTAINING SAME</p> <p>(54) Titre: CONJUGUES PEPTIDIQUES, LEUR UTILISATION A TITRE DE MÉDICAMENT ET COMPOSITIONS LES CONTENANT</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Peptide conjugates including a sequence of at least three amino acids selected from Lys-Lys-Gly, Gly-His-Lys and Glu-His-Lys, wherein "Lys" is Lysine or a halogenated derivative thereof, or a methylated Lysine derivative, particularly Methyl-Lysine and Dihydrobromo-Methyl-Lysine, said amino acids optionally being in D, L or DL form, and said sequence being chemically or physically conjugated with at least one compound selected from monocarboxylic acids of general formula (I): HOOC-R, or alcohol, aldehyde or amide derivatives thereof, and dicarboxylic acids of general formula (II): HOOC-R₁-COOH, are disclosed. The use of such conjugates as a drug, and pharmaceutical or cosmetic compositions containing said conjugates, are also disclosed.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention concerne des conjugués peptidiques comprenant une séquence d'au moins 3 acides aminés choisis parmi Lys-Lys-Gly, Gly-His-Lys et Glu-His-Lys, dans laquelle "Lys" représente la Lysine ou un dérivé halogéné de la Lysine, ou un dérivé méthylé de la Lysine, notamment Méthyl-Lysine et Dihydrobromo-Méthyl-Lysine, les acides aminés pouvant être sous la forme D, L ou DL; ladite séquence étant conjuguée chimiquement ou physiquement avec au moins un composé sélectionné parmi les acides monocarboxyliques de formule générale (I): HOOC-R, ainsi que leurs dérivés alcool, aldéhyde ou amide; les acides dicarboxyliques de formule générale (II): HOOC-R₁-COOH. Elle concerne également leur utilisation à titre de médicament et des compositions pharmaceutiques ou cosmétologiques les contenant.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

CONJUGUES PEPTIDIQUES, LEUR UTILISATION A TITRE DE MEDICAMENT ET COMPOSITIONS LES CONTENANT

Sous l'influence de processus physiologiques internes "peptides neurotransmetteurs" ou externes "radiations ionisantes et ultraviolettes",
5 les cellules de l'épiderme, en particulier les kératinocytes germinatifs sécrètent des facteurs de croissance et de coopération cellulaire, dont le rôle est de stimuler les synthèses cellulaires des molécules du cytosquelette et d'activer les interactions cellulaires.

Ces propriétés physiologiques se traduisent par une activation des
10 métabolismes cellulaires indispensables à la régénération des tissus conjonctifs du derme et de l'épiderme et des processus de cicatrisation.

La présente invention a pour objet la réalisation de molécules peptidiques, dérivés homologues des séquences peptidiques actives des facteurs de croissance et de coopération cellulaires, sécrétés
15 naturellement par les kératinocytes.

Parmi les dérivés peptidiques faisant l'objet de la présente invention figurent notamment des dérivés peptidiques et métallo-peptidiques dont les activités pharmacologiques sont orientées :
- d'une part, vers les synthèses cellulaires des molécules composant le
20 cytosquelette telles que les collagènes de type I et III, les glycosaminoglycanes, les fibronectines,
- d'autre part, vers la synthèse des molécules dont le rôle est de stimuler et d'activer les phénomènes de coopération et d'interaction cellulaire "endothélines, intégrines".

25 Ces activités étant complémentaires et indispensables à l'expression au niveau du derme et de l'épiderme, des processus de restructuration des tissus, cicatrisation, angiogénèse, mélanogénèse, etc...

Un des objets de la présente invention est l'utilisation des dérivés peptidiques et métallo-peptidiques précédents, pour le traitement en
30 application par voie topique, de la cicatrisation des plaies chroniques, telles que les lésions ulcéreuses du diabétique, les ulcères variqueux, la cicatrisation esthétique des plaies chirurgicales, le traitement préventif et curatif des vergetures et de leurs complications.

Dans les indications précédentes, les dérivés peptidiques peuvent
35 être utilisés en thérapeutique humaine et vétérinaire sous forme de "pommades, gels, solutions ou de spray".

Une des applications privilégiée de l'invention est l'utilisation des dérivés peptidiques dans les différents domaines de la cosmétologie, pour le traitement préventif et curatif des rides, du visage, du cou, et des mains, sous forme de lotions, gels, laits, crèmes, ou de spray, en application locale.

- 5 Une autre application des dérivés peptidiques de l'invention est leur utilisation comme agent d'activation et de potentialisation des mécanismes physiologiques de coopérations cellulaires.

Les dérivés peptidiques peuvent être utilisés seuls ou de préférence en association, avec des biomolécules ou composés naturels ou leurs
10 dérivés de synthèse, dont l'activité biologique spécifique, ne peut s'exprimer pleinement, que par la collaboration entre deux systèmes cellulaires complémentaires dont ils stimulent ou induisent qu'un seul élément.

C'est le cas, en particulier, des hormones mélanotropes qui
15 induisent la mélanogénèse dans les cellules mélanocytaires et dont l'expression au niveau de la surface de l'épiderme humain (race blanche) ne peut s'exprimer pleinement que par l'intime coopération entre les cellules mélanocytaires et les kératinocytes, formant ainsi une véritable unité fonctionnelle dénommée "Epidermal Melanin Unit".

- 20 Les mélanocytes activés par l' α MSH et ses dérivés sécrètent la mélanine, qui est transférée et dispersée, dans les kératinocytes, sous l'influence des facteurs peptidiques de coopération cellulaire et de leurs dérivés homologues.

Une des applications de la présente invention est l'utilisation des
25 dérivés peptidiques, précédemment décrits, dans les différents domaines de la dermatologie et de la cosmétologie.

- Les dérivés peptidiques peuvent être utilisés seuls ou en association avec d'autres molécules actives, tels que les dérivés homologues de
synthèse de l' α MSH, ou autres substances, sous la forme de crèmes, laits,
30 lotions, solutions ou sprays, en applications topiques (locales), pour l'accélération des processus de mélanogénèse de l'épiderme, accélération de la mélanisation de la peau par obtention d'un bronzage naturel et d'une protection totale contre les radiations solaires (UV).

Plus particulièrement la présente invention concerne des conjugués comportant une séquence peptidique comprenant au moins trois acides aminés choisis parmi Lys-Lys-Gly, Gly-His-Lys et Glu-His-Lys, dans laquelle "Lys" représente la Lysine ou un dérivé halogéné de la Lysine, ou un dérivé méthylé de la Lysine, notamment Méthyl-Lysine et Dihydrobromo-Méthyl-Lysine, les acides aminés pouvant être sous la forme D, L ou DL

Ces acides aminés étant sous leur forme naturelle ou non, ladite séquence étant utilisée sous forme peptidique, ou conjuguée chimiquement ou physiquement avec au moins un composé sélectionné parmi

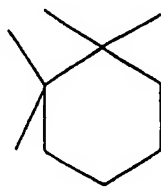
1) les acides monocarboxyliques de formule générale



dans laquelle R représente un radical aliphatique en C₁ à C₂₀ droit ou ramifié, substitué ou non, notamment un radical alkyl, alkényl ou alkynyl pouvant comporter une ou plusieurs insaturations et pouvant être substitué par un ou plusieurs radicaux choisis dans le groupe comprenant : NH₂, OH, oxo ou un radical cyclique non aromatique comportant de 5 à 6 atomes dans le cycle dont 1 ou 2 pouvant être différents du carbone, en particulier, S, O ou N, lesdits cycles pouvant être substitués par des radicaux alkyl en C₁ à C₃, notamment méthyl,

ainsi que les dérivés alcool ou aldéhyde ou amide des acides de formule I ; à la condition que si la séquence peptidique comprend uniquement Gly-His-Lys, elle n'est pas conjuguée à un seul résidu d'acide palmitique ;

Parmi les cycles pouvant être substitués, il faut citer les cycles



correspondant à des dérivés de l'acide rétinolique et de l'acide lipoïque.

Dans certains cas, la chaîne aliphatique peut consister en une chaîne polyalkényl.

Parmi les composés de formule I il faut citer de préférence les composés de formule :



de configuration cis ou trans dans laquelle R_2 est un radical alkyl en C_6 à C_{16} , comportant éventuellement un ou plusieurs substituants $-NH_2$, OH ou oxo.

2) les acides dicarboxyliques de formule générale



dans laquelle R_1 représente un radical aliphatique divalent notamment en C_3 à C_{10} , droit ou ramifié, substitué ou non, notamment un radical alkyl, alkylène, alkénylène ou alkynylène, pouvant comporter une ou plusieurs insaturations et pouvant être substitué par un ou plusieurs radicaux NH_2 ,

15 OH, oxo ou un radical alkyl en C_1 à C_3 .

Dans la formule générale I, il faut citer plus particulièrement les composés dans lesquels R représente :

- un radical monoinsaturé de configuration cis ou trans, de formule générale



dans laquelle R_2 représente un radical aliphatique notamment alkyl, linéaire ou ramifié comprenant au moins 6 atomes de carbone, de préférence 6 à 16 atomes de carbone, substitué par un groupe amino, hydroxy ou oxo ;

25 - un radical alkyl linéaire ou ramifié en C_1 - C_{20} éventuellement substitué par un ou plusieurs substituants choisis parmi : amino, hydroxy, oxo, thiol, imino, cycloalkyl en C_4 - C_7 , éventuellement substitué et si au moins 2 substituants sont présents, ils peuvent former ensemble une liaison, notamment un pont disulfure.

30 Les peptides conjugués selon l'invention sont liés sous forme de sels, d'esters, ou d'amides à des acides possédant des fonctions métaboliques essentielles dans l'activation du cycle tricarboxylique de Krebs.

Les acides de formule générale (I) ou (II) sont plus particulièrement choisis parmi les acides carboxyliques pour lesquels R₁ représente un alkylène en C₄-C₈ substitué ou non, en particulier, les acides acétiques, adipiques, α-amino-adipiques et dérivés, l'acide DL lipoïque et dérivés, l'acide dihydrolipoïque et son dérivé N-Lipoyl-Lysine, l'acide pimélique et dérivés, l'acide sébacique et dérivés.

Les acides gras pour lesquels R représente un reste alkylène linéaire ou ramifié, sont plus particulièrement les acides hydroxydécénoïques et décénoïliques, les acides rétinoïques et ses dérivés, le Rétinal et le Rétinol, l'acide myristique et ses dérivés, et l'acide palmitique, sous forme de sels d'esters, ou d'amides.

Des composés spécialement adaptés à l'obtention de conjugués selon l'invention sont choisis parmi l'acide acétique et ses dérivés, l'acide α-DL-Lipoïque et ses dérivés, l'acide dihydrolipoïque, la N-Lipoyl-Lysine, l'acide adipique, l'acide α-amino-adipique, l'acide pimélique, l'acide sébacique et ses dérivés, l'acide trans-10-hydroxy-Δ²-décénoïque et l'acide trans-oxo-9-decene-2-oïque, l'acide rétinoïque et ses dérivés, le rétinol, et le rétinol, l'acide myristique et l'acide palmitique.

Plus spécifiquement, la présente invention concerne des peptides inducteurs des synthèses endocellulaires des collagènes de type I et III et des glycosaminoglycanes, à haute activité cicatrisante et métabolique, ainsi que des molécules d'induction et de stimulation des processus de coopération cellulaire.

Les conjugués peptidiques selon l'invention comprennent de préférence au moins une des séquences peptidiques suivantes :

Lys-Lys-Gly

Gly-His-Lys

Glu-His-Lys

dans laquelle Lys représente la lysine ou un dérivé halogéné de la lysine, ou un dérivé méthylé de la lysine, notamment Méthyl-Lysine et Dihydrobromo-Méthyl-Lysine, les acides aminés pouvant être sous la forme D, L ou DL.

De préférence, les conjugués peptidiques répondent à l'une des formules générales suivantes :

A-X-Gly-His-Lys-Y (III), ou

A-X-Glu-His-Lys-Y (IV)

5 dans laquelle . A est un composé de formule générale I ou II ou le radical correspondant à ce composé

. X peut représenter une chaîne de 1 à 3 résidus Lys, éventuellement méthylée, en particulier à l'extrémité N terminale, OH, NH₂ ou une liaison

10 . Y peut représenter OH ou NH₂,

les acides aminés étant sous forme D, L ou DL

A est de préférence l'acide acétique, l'acide adipique, l'acide α-amino-adipique, l'acide DL lipoïque, l'acide dihydrolipoïque, la N-Lipoyl-Lysine, l'acide pimélique, l'acide sébacique, l'acide
15 trans-oxo-9-décène-2 oïque et l'acide trans-hydroxy-10-décène-2-oïque.

La présente invention concerne particulièrement les conjugués peptidiques suivants :

- 1 - A-MeLys-Lys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂
- 20 2 - A-MeLys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂
- 3 - A-MeLys-Gly-His-Lys-NH₂
- 4 - A-MeLys-Lys-Lys-Gly-His-Lys-OH
- 5 - A-MeLys-Lys-Gly-His-Lys-OH
- 6 - A-MeLys-Gly-His-Lys-OH
- 25 7 - A-Lys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂
- 8 - A-Lys-Gly-His-Lys-NH₂
- 9 - A-Lys-Lys-Gly-His-Lys-OH
- 10 - A-Lys-Gly-His-Lys-OH
- 11 - A-Lys-Lys-Glu-His-Lys-NH₂
- 30 12 - A-Lys-Glu-His-Lys-NH₂

- 13 - A-Glu-His-Lys-NH₂
- 14 - A-Lys-Lys-Glu-His-Lys-OH
- 15 - A-Lys-Glu-His-Lys-OH
- 16 - A-Glu-His-Lys-OH

5

A étant défini comme précédemment, ainsi que les dérivés de ces molécules sous forme de sels, d'esters, ou d'amides.

Les séquences d'acides aminés, mentionnés ci-dessus peuvent être des séquences d'acides aminés naturels ou non naturels.

10 Les conjugaisons selon la présente invention peuvent être effectués en faisant réagir la fonction amine ou acide de l'acide aminé avec une fonction amine ou acide de l'acide A, ou même il est possible de mettre à profit la présence d'une fonction hydroxy sur l'acide.

15 La présente invention concerne l'ensemble de ces conjugaisons ainsi que les conjugués non fonctionnels.

Les conjugués peptidiques précédemment décrits dans l'invention, peuvent être utilisés sous leur forme peptidique, ou liés avec un métal sous forme de complexes équimoléculaires.

20 Le métal utilisé pour la réalisation des complexes métallo-peptidiques de l'invention est de préférence un métal divalent notamment le Zinc (Zn), qui peut être couplé sous forme de sel, avec le groupement carboxylique de l'acide terminal, la lysine (Lys).

De même, dans certains cas, il est possible que certains amino-acides comportent par exemple des fonctions de glycosylation.

25 Il doit être entendu que la présente invention concerne également l'ensemble de ces formes.

30 Selon un autre aspect, l'invention concerne des compositions galéniques contenant au moins un conjugué peptidique tel que défini précédemment, avec des excipients cosmétologiquement et/ou pharmaceutiquement acceptables.

La présente invention concerne plus particulièrement l'utilisation à titre de médicament d'un, ou plusieurs des conjugués et dérivés peptidiques décrits précédemment selon l'invention.

La présente invention concerne également des préparations cosmétiques, contenant un, ou plusieurs conjugués et dérivés peptidiques décrits précédemment selon l'invention.

5 La présente invention concerne également des compositions galéniques, pharmaceutiques et cosmétologiques, comprenant au moins un des composés tels que défini précédemment.

Un des objets de la présente invention est l'utilisation par voie topique ou injectable des conjugués peptidiques et de leurs dérivés, composition ou association avec des principes actifs connus.

10 Ces conjugués peptidiques, leurs dérivés, composition ou association, peuvent être présentés sous forme d'ampoules injectables lyophilisées, et sous forme de crème, gels, laits, lotions ou sprays, et comporter des excipients connus.

15 Les conjugués peptidiques de l'invention, leurs dérivés, compositions, ou associations avec des principes actifs connus, sont utiles pour le traitement et la cicatrisation des plaies et lésions chroniques du diabétique, les ulcères variqueux, la cicatrisation des plaies chirurgicales, le traitement préventif et curatif des vergetures.

20 Le conjugué pourra notamment être associé à au moins une substance choisie parmi les antiseptiques, les antibiotiques à large spectre antimicrobien, ou les antifongiques à large spectre d'activité, pour la préparation d'une composition destinée au traitement par voie topique et à la cicatrisation des plaies infectées.

25 Selon un autre aspect, le conjugué peptidique peut être présenté sous forme d'associations ou de composés, avec des molécules connues pour leurs activités anticoagulantes et phlébotoniques par voie topique, destinées au traitement préventif et curatif, des vergetures, des insuffisances veineuses (jambes lourdes), de la couperose, en applications locales, sous forme de crèmes de gels, de laits ou de sprays.

30 Une des applications préférentielle de l'invention est l'utilisation des conjugués peptidiques, comme adjuvants, activateurs ou cofacteurs, en association avec des molécules choisies parmi l' α MSH ou ses dérivés homologues, l'ACTH ou la propiomélanocortine et leurs analogues dans des

compositions destinées au traitement préventif et curatif des troubles de la mélanogénèse, à la stimulation de la mélanogénèse épidermique, en vue de l'obtention d'un bronzage naturel rapide et d'une protection totale contre les radiations solaires ultraviolettes (DEM).

5 Une autre des applications préférentielles de l'invention est l'utilisation des conjugués peptidiques dans les différentes formulations cosmétologiques pour le traitement préventif et curatif des rides, du visage, du cou et des mains, sous forme d'émulsions, de crèmes, de laits, de lotions, de gels, ou de sprays en application locale.

10 Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

Dans ces exemples on se référera aux Figures suivantes :

Figure 1 : Intensité de fluorescence de fibroblastes marqués à la rhodamine : mise en évidence du collagène de type I.

15 Figures 2 et 3 : Mise en évidence par mesure de l'intensité de coloration de la synthèse de collagène par des cellules traitées ou non par le conjugué n° 7.

Exemple n° 1 - Synthèse du conjugué 7

20

A-Lys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂

A = Acide Adipique = COOH-(CH₂)₄-COOH

25 La synthèse a été réalisée par la méthode de Merrifield adaptée à la structure du conjugué selon les étapes suivantes :

Z-Gly-His-Lys-NH₂ :

30

A une solution dans la diméthylformamide (10 mL) contenant Z-Gly-OH (2.08 g, 10 mmoles), BOP (4.42 g, 10 mmoles), de la diisopropyléthylamine (DIEA, 22 mmoles) est additionné sous agitation et à 0° C, le chlorhydrate de H-His-Lys-NH₂ (2.1 g, 11 mmoles).

- 5 Après 6 heures d'agitation à la température ambiante, le solvant de la réaction est évaporé sous vide à une température inférieure à 40° C.

Le résidu est dissout dans de l'acétate d'éthyle (200 mL).

- La phase organique est lavée plusieurs fois avec une solution saturée de bicarbonate de sodium (2 x 50 mL), à l'eau (2 x 50 mL), avec une
10 solution saturée de KHSO₄ (2 x 50 mL), à l'eau (2 x 50 mL).

La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et concentrée sous vide pour conduire à une mousse blanche (3.1 g, 91%) homogène en chromatographie sur gel de silice.

- 15 Z-Lys(Boc)-Gly-His-Lys-NH₂

Le composé Z-Gly-His-Lys-NH₂ (3.45 g, 10 mmoles) est dissout dans l'éthanol 95 (100 mL) contenant 20 mmoles d'acide chlorhydrique.

Le mélange réactionnel est hydrogéné pendant 5 heures.

- 20 Le catalyseur est filtré et le solvant concentré sous vide à une température inférieure à 40° C.

Le résidu restant est trituré plusieurs fois avec de l'éther, décanté. Il est séché sous vide en présence de KOH. Ce résidu est dissout dans la diméthylformamide (10 mL) en présence de Z-Lys(Boc)-OH, (3,81 g, 10
25 mmoles), BOP (4.42 g, 10 mmoles), de la diisopropyléthylamine (DIEA, 22 mmoles).

Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0° C, puis 4 heures à la température ambiante.

- Le solvant de la réaction est évaporé sous vide à une température
30 inférieure à 40° C.

Le résidu est dissout dans de l'acétate d'éthyle (200 mL).

La phase organique est lavée plusieurs fois avec une solution saturée de bicarbonate de sodium (2 x 50 mL), à l'eau (2 x 50 mL), avec une solution saturée de KHSO₄ (2 x 50 mL), à l'eau (2 x 50 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et concentrée sous vide pour
5 conduire à une mousse blanche (4.7 g, 82%) homogène en chromatographie sur gel de silice.

Z-Lys-(Boc)-Lys-(Boc)-Gly-His-Lys-NH₂

10 Le composé ZLys(Boc)-Gly-His-Lys-NH₂ (5.7 g, 10 mmoles) est dissout dans l'éthanol 95 (150 mL) contenant 10 mmoles d'acide chlorhydrique.

Le mélange réactionnel est hydrogéné pendant 5 heures.

Le catalyseur est filtré et le solvant concentré sous vide à une
15 température inférieure à 40° C.

Le résidu restant est trituré plusieurs fois avec de l'éther, décanté. Il est séché sous vide en présence de KOH. Ce résidu est dissout dans la diméthylformamide (10 mL) en présence de Z-Lys(Boc)-OH, (3,81 g, 10 mmoles), BOP (4.42 g, 10 mmoles), de la diisopropyléthylamine (DIEA, 22
20 mmoles).

Le mélange réactionnel est agité 30 min à 0° C, puis 6 heures à la température ambiante.

Le solvant de la réaction est évaporé sous vide à une température inférieure à 40° C.

25 Le résidu est dissout dans de l'acétate d'éthyle (300 mL).

La phase organique est lavée plusieurs fois avec une solution saturée de bicarbonate de sodium (2 x 50 mL), à l'eau (2 x 50 mL), avec une solution saturée de KHSO₄ (2 x 50 mL), à l'eau (2 x 50 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et concentrée sous vide pour
30 conduire à une mousse blanche (6.5 g, 81%) homogène en chromatographie sur gel de silice.

A-Lys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂

Le composé ZLys(Boc)-Lys(Boc)-Gly-His-Lys-NH₂ (8 g, 10 mmoles) est dissout dans l'éthanol 95 (200 mL) contenant 20 mmoles d'acide chlorhydrique.

Le mélange réactionnel est hydrogéné pendant 5 heures.

5 Le catalyseur est filtré et le solvant concentré sous vide à une température inférieure à 40° C.

Le résidu restant est trituré plusieurs fois avec de l'éther décanté. Il est séché sous vide en présence de KOH. Ce résidu est dissout dans la diméthylformamide (10 mL) en présence d'acide adipique (2.1 g, 10
10 mmoles), BOP (4.42 g, 10 mmoles), de la diisopropyléthylamine (DIEA, 22 mmoles).

Le mélange réactionnel est agité 15 min à 0° C, puis 5 heures à la température ambiante.

15 Le solvant de la réaction est évaporé sous vide à une température inférieure à 40° C.

Le résidu est dissout dans de l'acétate d'éthyle (200 mL).

La phase organique est lavée plusieurs fois avec une solution saturée de bicarbonate de sodium (2 x 50 mL), à l'eau (2 x 50 mL), avec une solution saturée de KHSO₄ (2 x 50 mL), à l'eau (2 x 50 mL). La phase
20 organique est séchée sur sulfate de sodium et concentrée sous vide pour conduire à une poudre blanche (7.5 g, 76%) homogène en chromatographie sur gel de silice.

Ce composé est dissout dans l'acide trifluoroacétique (50 mL).

Après 30 min, le solvant est concentré sous vide à une température
25 inférieure à 40° C et le résidu trituré plusieurs fois avec de l'éther anhydre.

La poudre blanche obtenue (6.9 g, 88%) est séchée sous vide.

Adipoyl-Lys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂

Exemple n° 2 - Synthèse du conjugué 8

A-Lys-Gly-His-Lys-NH₂

A = Trans-10-Hydroxy-déc2-énoïc-acide

5

La synthèse a été réalisée par la méthode de Merrifield adaptée selon les étapes suivantes et la méthodologie décrite à l'exemple n°1 :

- 1 - Z-Gly-OH + H-His-Lys-NH₂
- 10 2 - Z-Gly-His-Lys-NH₂
- 3 - Z-Lys-(BOC)-Gly-His-Lys-NH₂
- 4 - A-BOP, DIEA, DMF
- 5 - Decenoyl-Lys-Gly-His-Lys-NH₂

15

Préparation du complexe métallo-peptidique avec le Zinc.

On utilise le sel de Zinc sous forme de ZnCl₂.

Le conjugué peptidique précédemment obtenu est mis en solution à pH.56 dans l'eau distillée dans les proportions suivantes :

1 molécule du conjugué n° 8 dans une solution de ZnCl₂ à 10%.

20

Après chauffage à 20° C pendant 10 mn, le complexe est purifié sur colonne de Biogel P-2 pour éliminer l'excès de chlorure de Zinc non fixé sur le peptide, et élué avec de l'eau distillée.

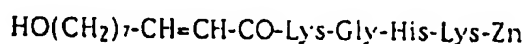
Après élution, on obtient une solution contenant 0,5% ce ZnCl₂ pour une molécule peptidique.

25

La solution est ensuite congelée à basse température "-60° C" et lyophilisée.

On obtient le complexe métallo-peptidique sous forme de poudre blanche dont la formule est la suivante :

30



ou (Trans-10-hydroxy-déc2-énoïc-Lys-Gly-His-Lys-Zn)

dont les caractères analytiques sont les suivants :

5	Caractères organoleptiques :	Lyophilisat blanc soluble dans l'eau.
	Pureté HPLC :	95%.
	Spectrométrie de masse "hors Zinc"	PM 636.+6363.6
10	Composition en acides aminés (% hors Zinc)	
	Lysine	42,95%
	Histidine	21,55%
	Glycine	8,97%

15

Exemple 3 - Etude du pouvoir cicatrisant du conjugué peptidique n° 7 chez l'animal "rat"

But de l'étude

20

Déterminer le pouvoir cicatrisant du peptide n° 7 administré chez le rat-OFA par applications topiques aux doses de 0,75 µg, 7,5 µg et 75 µg par animal pendant cinq jours.

25 Matériel et méthode

I - Animaux : rats de souche OFA, OF1, IFFA-CREDO, pesant de 250 à 300 g.

II - Produits à tester

30

Conjugué peptidique n° 7, correspondant la formule :
Adipoyl-Lys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂.

Mis en solution dans le propylène glycol aux doses de 1,5 µg/ml, 15 µg/ml, 150 µg/ml.

III - Méthode

5

Après anesthésie générale à l'éther, une incision de 5 cm de long a été pratiquée sur la flanc droit des animaux.

Une suture en fil trinyl 2/0 a été effectuée à raison d'un point tous les 0,5 cm.

10

Les animaux traités comme les témoins ont subi la même intervention dans les mêmes conditions.

Le traitement a débuté le lendemain de l'intervention sur les lots d'animaux traités aux doses de 0,5 ml de solution peptidique sur chaque incision.

15

Soit 0,75 µg, 7,5 µg et 75 µg de peptide par animal et par application pendant la durée du traitement, soit 5 jours.

Les animaux ont été mis en observation pendant 9 jours, ils ont ensuite été sacrifiés par une dose létale de penthiobarbital.

20 Les zones de peau en cours de cicatrisation ont été prélevées et soumises aux "tests" d'étirement au dynamomètre, pour mesurer la résistance de la cicatrice à l'étirement.

Analyse statistique des résultats

25

Une analyse statistique a été effectuée sur les valeurs de résistance obtenue au dynamomètre.

Une analyse de variance et un test de "T" student a été pratiqué sur les valeurs individuelles, afin de définir le seuil de signification des résultats.

30

Résultats

Le peptide n°7, administré aux doses de 0,75 µg, 7,5 µg et 75 µg, par jour et pendant 5 jours consécutifs, aux animaux en expérimentation, augmente de façon hautement significative, la cicatrisation des plaies chez

les animaux traites par rapport aux témoins, aux doses de :

0,75 µg l'augmentation est de 14,5%,

7,5 µg l'augmentation est de 30,9%,

75 µg l'augmentation est de 59,6%.

- 5 On observe en particulier une cicatrisation totale chez les animaux traités, à partir du 3ème jour, alors que les témoins ne présentent pas de signe visible de cicatrisation.

L'aspect des cicatrises au 9ème jour présente chez les animaux traités, une cicatrisation parfaitement plate, avec absence de bourrelets cicatriciels.

Tableau n° 1

15 Animaux traités par 0,75 µg/jour/5 jours par peptide formule n° 7
Résistance des cicatrices à l'étirement "dynamométrie"

20	Groupe Témoin		Groupe Traité	
	Animaux	Dynes	Animaux	Dynes
25	894923	26,2	894918	28,5
	894924	23,7	894919	26,1
	894925	22,5	894920	29,3
	894926	25,4	894921	27,7
	894927	24,8	894922	28,6
	Moyenne	24,5 +/- 1,5	Moyenne	28,0 +/- 1,2

30

Tableau n° 2

5 Animaux traités par 7,5 µg/jour/5 jours par peptide formule
n° 7

10	Groupe Témoin		Groupe Traité	
	Animaux	Dynes	Animaux	Dynes
	89-4923	26,2	89-4928	32,6
	89-4924	23,7	89-4929	30,4
	89-4925	22,5	89-4930	33,1
	89-4926	25,4	89-4931	32,3
15	89-4927	24,8	89-4932	31,8
	Moyenne	24,5 +/- 1,5	Moyenne	32,0 +/- 1,0

Tableau n° 3

20 Animaux traités par 7,5 µg/jour/5 jours par peptide formule
n° 7

25	Groupe Témoin		Groupe Traité	
	Animaux	Dynes	Animaux	Dynes
	89-4923	26,2	89-4933	39,8
30	89-4924	23,7	89-4934	41,3
	89-4925	22,5	89-4935	37,5
	89-4926	25,4	89-4936	36,2
	89-4927	24,8	89-4937	40,7
35	Moyenne	24,5 +/- 1,5	Moyenne	39,1 +/- 2,2

Conclusions

- 5 Les résultats obtenus au cours de cette étude permettent de conclure que le peptide n° 7 possède une action cicatrisante hautement significative.

Pour les doses de 75 µg par jour pendant 5 jours la différence entre le groupe traité et le groupe témoin est de 59,6%.

- 10 **Exemple 4 - Mise en évidence de l'activité du conjugué n° 7 sur la synthèse de collagène de type I par des fibroblastes en culture**

- 15 La mise en évidence de l'influence du conjugué n° 7 sur la synthèse de collagène de type I par des cellules en culture a été réalisée sur deux types cellulaires :

- des fibroblastes humains de plastie mammaire au 3ème passage, obtenus dans notre laboratoire de culture cellulaire à l'IEB,
- des MRC5, fibroblastes de poumon embryonnaire humain non transformés au passage p38, obtenus à p 25-30 chez ICN FLOW.

- 20 Les cellules sont stimulées ou non avec le conjugué n° 7, puis elles sont observées au microscope photonique à fluorescence après révélation du collagène de type I par une réaction d'immuno-fluorescence secondaire.

25

Matériel et méthode

Culture cellulaire :

- 30 Les cellules sontensemencées à raison de 70 000 cellules par ml pour les fibroblastes de primoculture et 20 000 pour les MRC5.

La culture est réalisée en DMEM 10% SVF dans les tubes de Leighton contenant une lamelle dans le fond du tube, volume final : 1,6 ml.

8 tubes sont prévus par type cellulaire : 3 témoins et 5 concentrations.

5

Préparation des produits :

Préparation d'une solution mère du conjugué n° 7 à $2,34 \cdot 10^{-3}$ M : M1

10	M	Vol de M	Vol de PBS-BSA	Vol M
	M2	2 ml M1	2,68 ml	10^{-3} M
15	M3	0,01 ml M2	1 ml	10^{-5} M
	M4	0,01 ml M3	1 ml	10^{-7} M
	M5	0,01 ml M4	1 ml	10^{-9} M
20				

Ces différentes solutions mères seront ajoutées au milieu de culture au moment du contact produit.

25 Les dilutions sont réalisées dans du PBS (Eurobio) - BSA 0,1% (Flucka) puis filtrées sur filtres $0,22 \mu\text{m}$ (Sartorius).

Méthodologie

30 A J0, le milieu est éliminé et remplacé par du milieu frais auquel est ajouté le conjugué n° 7 aux différentes concentrations selon le tableau suivant :

	C	Concentration finale	Vol milieu	Vol M
5				
	C1	10^{-4} M	1,5 ml	0,15 ml M2
	C2	10^{-5} M	1,5 ml	0,015 ml M2
10	C3	10^{-7} M	1,5 ml	0,015 ml M3
	C4	10^{-9} M	1,5 ml	0,015 ml M4
	C5	10^{-7} M	1,5 ml	0,015 ml M5
15				

Les témoins T0 et T ne reçoivent que du milieu.

T1 est traité comme C1.

20 Fixation des cellules

Le milieu est éliminé ; les tubes sont rincés 3 fois avec du DMEM sans sérum à 37° C.

25 Les cellules sont fixées 20 mn à 4°C en présence de PFA 2,5% (Prolabo) dans du Hanks (Eurobio).

3 rinçages en DMEM sans sérum sont effectués suivis de 2 lavages 10 mn en PBS sans calcium ni magnésium (Eurobio).

Marquage des cellules

30

* Réaction primaire : fixation du premier anticorps de souris anticollagène humain de type I dilué au 1/100ème dans du PBS.

Les lamelles sont sorties des tubes et séchées. La face portant les cellules est repérée et signalée (un angle est cassé pour repère).

100 ml d'anticorps primaire sont mis au contact des cellules pour les conditions C1 à C5.

5 Les lamelles T et T1 restent dans les tubes avec du PBS sans calcium ni magnésium car ce sont des témoins pour le deuxième anticorps.

Les lamelles sont placées en chambre humide pour éviter la déshydratation à +4° C sous agitation douce durant toute la nuit.

10 * Réaction secondaire : cette étape révèle la réaction primaire par un anticorps secondaire de chèvre anti-Ig G de souris marqué TRITC : Sigma réf. T-7782 lot 044H4831.

L'anticorps primaire est éliminé et les lamelles sont lavées 2 fois au PBS pendant 10 mn à température ambiante.

15 Puis un lavage en PBS 0,1% BSA est réalisé 10 mn supplémentaires.

100 ml d'anticorps secondaire dilué au 1/120ème sont mis au contact des cellules de toutes les lamelles à température ambiante durant 1 heure.

L'anticorps est ensuite éliminé et les lamelles sont lavées au PBS 0,1% BSA 10 mn, puis 4 fois 5 mn à l'eau osmosée.

20 Une fois séchées les lamelles sont montées côté cellules sur une lame de microscopie contre une goutte de liquide de montage (Sigma). Les bords des lamelles sont lutés au vernis.

Résultats

25 Les observations microscopiques sont réalisées sur un microscope droit à fluorescence Zeiss (Axioplan), surmonté d'une caméra 3 CCD Sony (MC-3215 P/M) reliée à un moniteur vidéo Trinitron avec écran couleur Sony. L'ensemble est connecté à une imprimante couleur Sony (UP-7000p).

30 Les observations des lames sont faites avec l'objectif Plan Apochromat x 63 à l'huile.

Les cellules sont d'abord observées en contraste interférentiel et/ou de phase. Quand un champ est sélectionné, l'image est enregistrée, puis sans bouger d'endroit l'observation est réalisée en fluorescence et enregistrée.

- 5 Ainsi pour chaque prise de vue nous disposons simultanément à l'écran ou superposées les 2 images mémorisées.

Conclusions

- 10 Comme le montre l'ensemble de ces résultats, le conjugué n° 7 à 10-11 M stimule très significativement la synthèse de collagène de type I par des fibroblastes de primoculture.

- 15 La couleur rouge indique la fixation des anticorps secondaires marqués à la rhodamine sur les anticorps anti-collagène de type I. Cette couleur témoigne donc de la présence de collagène de type I synthétisée par les fibroblastes en culture.

La luminosité moyenne du rouge sur l'ensemble de l'image des cellules traitées avec le conjugué n° 7 à 10-11 M est de 54,8 alors que pour les cellules non traitées elle n'est que de 32,78.

- 20 Le conjugué n° 7 stimule la synthèse de collagène de type I par les fibroblastes humains de primocultures de manière significative : +67%.

Les résultats non présentés ici, obtenus sur les MRC5 donnent les mêmes tendances.


- 25 (Voir figures 1 à 3).

LEGENDES DES FIGURES


Figure 1 :


30

Intensité de fluorescence de fibroblastes marqués à la rhodamine : mise en évidence du collagène de type I

 10-11 M

35

 10-9 M

 10-7 M

 T

REVENDICATIONS

1. Conjugué peptidique caractérisé en ce qu'il comprend une
séquence d'au moins 3 acides aminés choisis parmi Lys-Lys-Gly, Gly-His-
5 Lys et Glu-His-Lys,
dans laquelle "Lys" représente la Lysine ou un dérivé halogéné de la
Lysine, ou un dérivé méthylé de la Lysine, notamment Méthyl-Lysine et
Dihydrobromo-Méthyl-Lysine, les acides aminés pouvant être sous la
forme D, L ou DL,

10 ladite séquence étant conjuguée chimiquement ou physiquement avec au
moins un composé sélectionné parmi

- les acides monocarboxyliques de formule générale



15 dans laquelle R représente un radical aliphatique en C₁-C₂₀, linéaire ou
ramifié, éventuellement substitué, pouvant comporter une ou plusieurs
insaturations,

ainsi que les dérivés alcool ou aldéhyde ou amide des acides de formule I ;
à la condition que si la séquence peptidique comprend uniquement Gly-
His-Lys, elle n'est pas conjuguée à un seul résidu d'acide palmitique ;

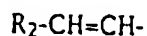
20 - les acides dicarboxyliques de formule générale



25 dans laquelle R₁ représente un radical aliphatique divalent, comprenant
au moins 3 atomes de carbone, de préférence 3 à 10 atomes de carbone,
droit ou ramifié, notamment un radical alkyl, alkylène, alkénylène ou
alkynylène, pouvant comporter une ou plusieurs insaturations
éventuellement substitué, notamment par un ou plusieurs groupes amino,
hydroxy, oxo ou un radical alkyl en C₁-C₃.

30 2. Conjugué selon la revendication 1, caractérisé en ce que dans la
formule générale I, R peut représenter :

- un radical monoinsaturé de configuration cis ou trans, de formule
générale

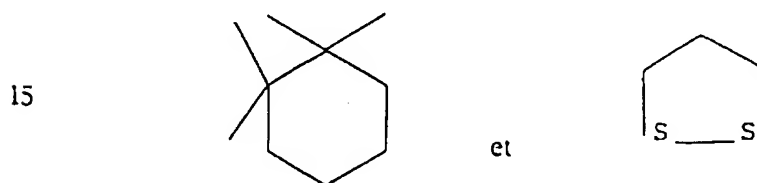


35 dans laquelle R₂ peut représenter un radical alkyle linéaire ou ramifié
comprenant au moins 6 atomes de carbone, de préférence 6 à 16 atomes de
carbone éventuellement, substitué par un groupe amino, hydroxy ou oxo ;

- un radical aliphatique linéaire ou ramifié en C_1 - C_{20} substitué ou non, notamment un radical alkyl, alkényl ou alkynyl pouvant comporter une ou plusieurs insaturations et pouvant être substitué par un ou plusieurs radicaux choisis dans le groupe comprenant :

- 5 NH_2 , OH , oxo, thiol ou un radical cyclique non aromatique comportant de 5 à 6 atomes dans le cycle dont 1 ou 2 pouvant être différents du carbone, en particulier, S, O ou N, lesdits cycles pouvant être substitués par des radicaux alkyl en C_1 à C_3 , notamment méthyl.

- 10 3. Conjugué selon la revendication 2, caractérisé en ce que lorsque R représente une chaîne aliphatique en C_1 - C_{20} , elle peut être substituée par un cycle choisi parmi



- 20 4. Conjugué selon la revendication 1, caractérisé en ce que dans la formule II, R_1 représente un reste alkylène en C_4 - C_8 éventuellement substitué.

- 25 5. Conjugué selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la séquence d'acides aminés est liée à l'acide de formule I ou II ou à son dérivé sous forme de sel, d'ester ou d'amide.

- 30 6. Conjugué selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que l'acide de formule générale I est choisi parmi l'acide acétique, l'acide DL lipoïque, l'acide dihydrolipoïque, la N-lipoïl-lysine, les acides hydroxydécanoïques et décanoïques, l'acide rétinol et ses dérivés, le rétinol et le rétinol, l'acide myristique et ses dérivés, l'acide palmitique, sous forme de sels, d'esters ou amides, et en ce que l'acide de formule générale II est choisi parmi l'acide adipique, l'acide α -amino adipique, l'acide pimélique, l'acide sébacique et leurs dérivés.

7. Conjugué selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que les acides de formules générales I ou II sont de préférence choisis parmi l'acide acétique et ses dérivés, l'acide α -DL-Lipoïque et ses dérivés,
5 l'acide dihydrolipoïque, la N-Lipoyl-Lysine, l'acide adipique, l'acide α -amino-adipique, l'acide pimélique, l'acide sébacique et ses dérivés, l'acide trans-10-hydroxy- Δ 2-décénoïque et l'acide trans-oxo-9-decène-2-oïque, l'acide rétinoïque et ses dérivés, le rétinol, et le rétinol, l'acide myristique et l'acide palmitique.

10

8. Conjugué selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il présente la formule générale

A-X-Gly-His-Lys-Y (III), ou

A-X-Glu-His-Lys-Y (IV)

15 dans laquelle . A est un composé de formule générale I ou II, ou le radical correspondant

. X peut représenter une chaîne de 1 à 3 résidus Lys, éventuellement méthylés, OH, NH₂ ou une liaison

. Y peut représenter OH ou NH₂,

20 les acides aminés étant sous forme D, L ou DL

9. Conjugué selon l'une des revendications de 1 à 8 caractérisé en ce qu'il est sélectionné parmi les dérivés peptidiques suivants :

- 25 1 - A-MeLys-Lys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂
2 - A-MeLys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂
3 - A-MeLys-Gly-His-Lys-NH₂
4 - A-MeLys-Lys-Lys-Gly-His-Lys-OH
5 - A-MeLys-Lys-Gly-His-Lys-OH
30 6 - A-MeLys-Gly-His-Lys-OH
7 - A-Lys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂

- 8 - A-Lys-Gly-His-Lys-NH₂
- 9 - A-Lys-Lys-Gly-His-Lys-OH
- 10 - A-Lys-Gly-His-Lys-OH
- 11 - A-Lys-Lys-Glu-His-Lys-NH₂
- 5 12 - A-Lys-Glu-His-Lys-NH₂
- 13 - A-Glu-His-Lys-NH₂
- 14 - A-Lys-Lys-Glu-His-Lys-OH
- 15 - A-Lys-Glu-His-Lys-OH
- 16 - A-Glu-His-Lys-OH

10

"A" étant un acide de formule générale I ou II telles que définies dans les revendications de 1 à 7, ainsi que les dérivés de ces molécules sous forme de sels d'esters ou d'amides.

15

10. Conjugué selon l'une des revendications de 1 à 9, caractérisé en ce qu'il est sous forme de complexes métallopeptidiques liés physiquement ou chimiquement à un sel de Zinc.

20

11. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un conjugué selon l'une des revendications 1 à 10 avec des excipients pharmaceutiquement acceptables.

25

12. Composition galénique pharmaceutique, comprenant au moins un des conjugués peptidiques selon l'une des revendications 1 à 10, présentées sous forme de pommades, de crèmes dermiques, de gels, de lotions et de sprays, destinés à la médecine humaine et vétérinaire pour le traitement et la cicatrisation des plaies.

13. Composition galénique pharmaceutique, comprenant au moins un conjugué peptidique, selon l'une des revendications de 1 à 10, caractérisée en ce que le conjugué est associé à au moins une substance choisie parmi les antiseptiques, les antibiotiques à large spectre antimicrobien, ou les antifongiques à large spectre d'activité, destinée au traitement par voie topique et à la cicatrisation des plaies infectées.

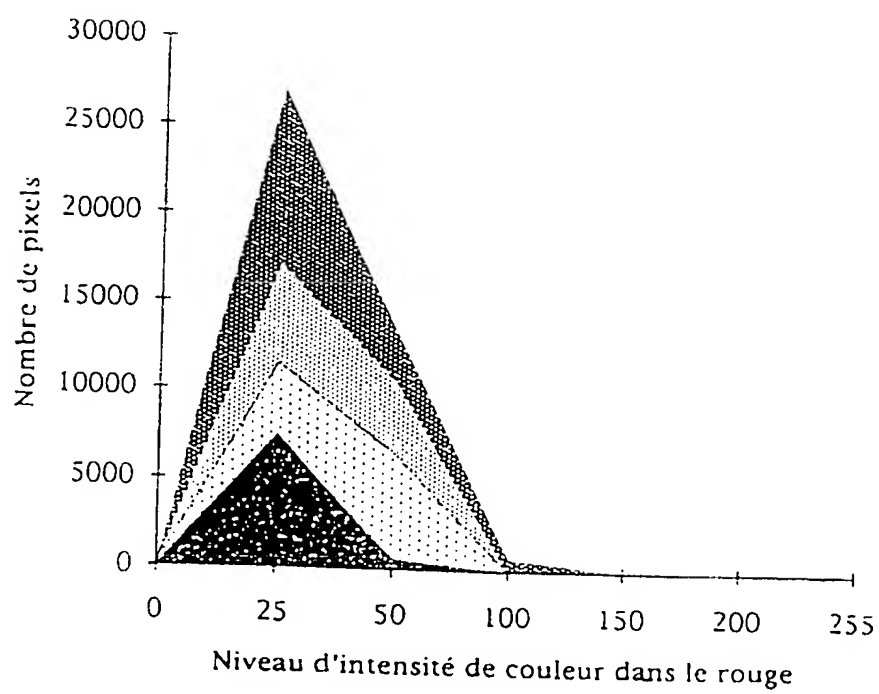
14. Composition galénique à usage pharmaceutique et cosmétologique, comprenant au moins un des conjugués peptidiques selon les revendications de 1 à 10, présenté sous forme d'associations ou de composés, avec des molécules connues pour leurs activités anticoagulantes et phlébotoniques par voie topique, destinées au traitement préventif et curatif, des vergetures, des insuffisances veineuses (jambes lourdes), de la couperose, en applications locales, sous forme de crèmes de gels, de laits ou de sprays.

15. Composition galénique à usages pharmaceutiques et cosmétologiques, comprenant au moins un des conjugués peptidiques selon les revendications de 1 à 10 utilisés seuls, ou sous forme d'associations, de composés, ou de complexes, avec des molécules connues pour leur dérivés homologues de l' α MSH, de l'ACTH, et de la proopiomélanocortine, présentées sous forme de crèmes, de gels, de laits, de lotions ou de sprays, pour applications topiques, et destinées au traitement préventif et curatif des troubles de la mélanogénèse, à l'accélération de la mélanisation de l'épiderme, et à l'obtention d'un bronzage cutané naturel, et d'une protection totale contre les radiations solaires ultra-violettes (UVA-UVB).

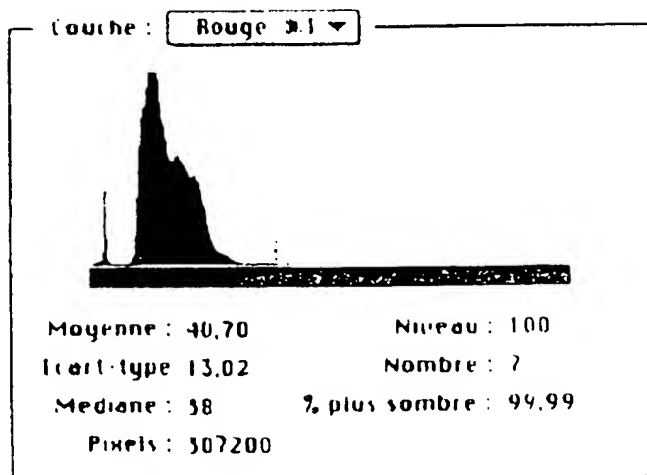
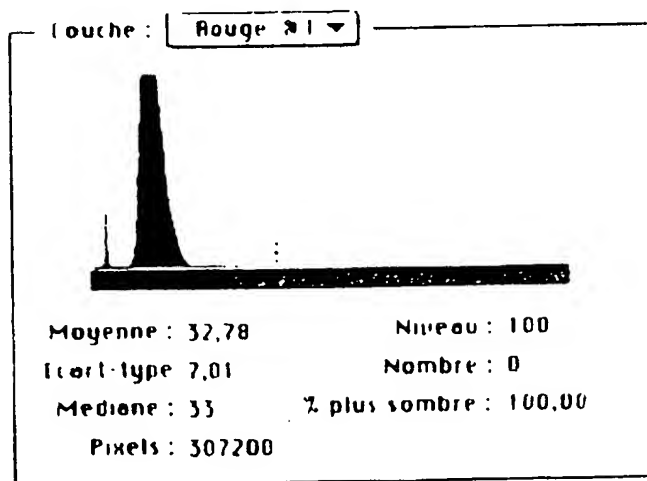
16. Conjugué peptidique selon l'une des revendications 1 à 10, pour son utilisation à titre de médicament.

17. Composition cosmétologique contenant au moins un conjugué selon l'une des revendications 1 à 10 présentées sous forme de crèmes, de gels, de lotions, ou de sprays, pour applications par voie topique destinées au traitement préventif et curatif des rides du visage, du cou et des mains.

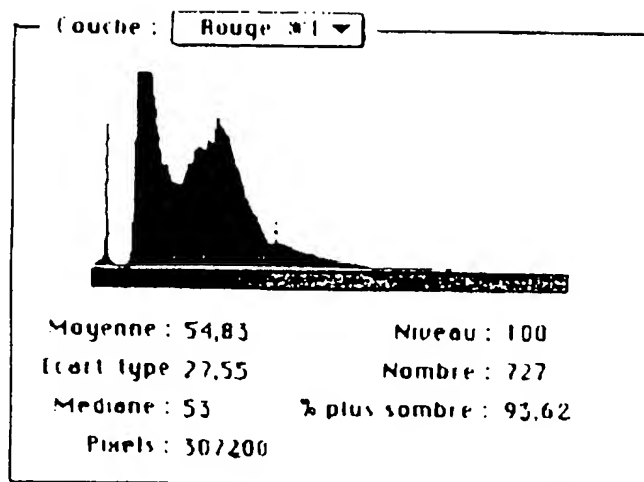
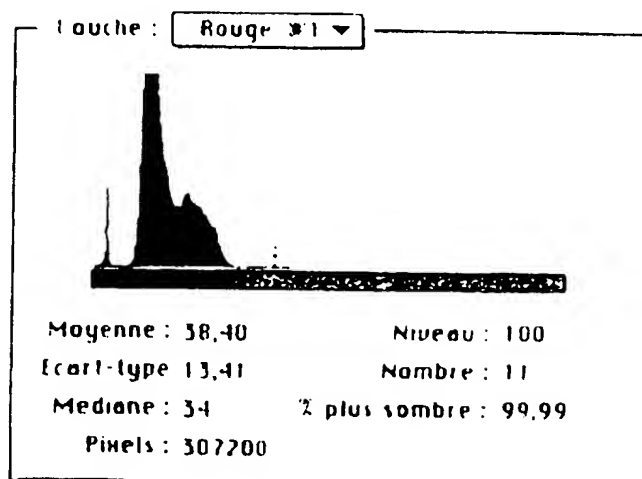
1 / 3

FIG.1

2 / 3

FIG. 2AFIG. 2B

3/3

FIG. 3AFIG. 3B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No
PCT/FR 96/01811

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K7/06 C07K5/08 C07K5/10 A61K38/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 91 12267 A (PROCYTE CORPORATION) 22 August 1991 see the whole document ---	1-17
A	WO 91 07431 A (PROCYTE CORPORATION) 30 May 1991 see the whole document ---	1-17
A	DE 41 27 790 A (A WANK) 25 February 1993 see the whole document -----	1-17

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 March 1997

Date of mailing of the international search report

25.03.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 96/01811

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 1-3
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Due to the extremely broad scope of claims 1-3, which cover all sequences containing the tripeptides of claim 1, a complete search is not possible for reasons of economy.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In tional Application No

PCT/FR 96/01811

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9112267 A	22-08-91	US 5118665 A AU 7254491 A CA 2075705 A EP 0514460 A JP 5503939 T	02-06-92 03-09-91 10-08-91 25-11-92 24-06-93
WO 9107431 A	30-05-91	US 5120831 A AU 652136 B AU 6878191 A CA 2068324 A EP 0500745 A JP 5501567 T US 5550183 A	09-06-92 18-08-94 13-06-91 14-05-91 02-09-92 25-03-93 27-08-96
DE 4127790 A	25-02-93	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No
PCT/FR 96/01811

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C07K7/06 C07K5/08 C07K5/10 A61K38/04		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 C07K A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 91 12267 A (PROCYTE CORPORATION) 22 Août 1991 voir le document en entier ---	1-17
A	WO 91 07431 A (PROCYTE CORPORATION) 30 Mai 1991 voir le document en entier ---	1-17
A	DE 41 27 790 A (A WANK) 25 Février 1993 voir le document en entier -----	1-17
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">6 Mars 1997</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">25.03.97</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Masturzo, P</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

demande internationale n°

PCT/FR 96/01811

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n°
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:

2. ☒ Les revendications n° 1-3
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
A cause de l'énorme étendue des revendications 1-3, qui couvrent toute séquence contenant les tryptides de la revendication 1, il s'est avéré qu'une recherche complète n'est pas possible pour des raisons d'économie.

3. ☐ Les revendications n°
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.

2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.

3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°:

4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°:

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux ...mbres de familles de brevets

Démv Internationale No

PCT/FR 96/01811

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9112267 A	22-08-91	US 5118665 A	02-06-92
		AU 7254491 A	03-09-91
		CA 2075705 A	10-08-91
		EP 0514460 A	25-11-92
		JP 5503939 T	24-06-93

WO 9107431 A	30-05-91	US 5120831 A	09-06-92
		AU 652136 B	18-08-94
		AU 6878191 A	13-06-91
		CA 2068324 A	14-05-91
		EP 0500745 A	02-09-92
		JP 5501567 T	25-03-93
		US 5550183 A	27-08-96

DE 4127790 A	25-02-93	AUCUN	

PEPTIDE CONJUGATES, THEIR USE AS MEDICINAL PRODUCTS AND
COMPOSITIONS CONTAINING THEM

Under the influence of internal "peptide neurotransmitter" or external "ultraviolet and ionizing
5 radiation" physiological processes, epidermal cells, in particular germinating keratinocytes, secrete growth factors and cell cooperation factors, whose role is to stimulate the cellular synthesis of cytoskeletal molecules and to activate cellular interactions.

10 These physiological properties are reflected by an activation of cell metabolisms which are essential for the regeneration of the connective tissues of the dermis and the epidermis and cicatrization processes.

The present invention relates to the production
15 of peptide molecules, homologous derivatives of the active peptide sequences of cell growth factors and cell cooperation factors, secreted naturally by keratinocytes.

Among the peptide derivatives forming the subject of the present invention are featured, in particular,
20 peptide and metallopeptide derivatives whose pharmacological activities are oriented:

- on the one hand, toward the cellular synthesis of molecules forming the cytoskeleton, such as collagens of type I and type III, glycosaminoglycans and fibronectins,
- 25 - on the other hand, toward the synthesis of molecules whose role is to stimulate and activate the phenomena of cellular cooperation and interaction - "endothelins, integrins".

These activities are complementary and essential
30 for dermal and epidermal expression, for tissue restructuring processes, cicatrization, angiogenesis, melanogenesis, etc.

One of the subjects of the present invention is the use of the above peptide and metallopeptide derivatives for the treatment, in topical application, of
35 cicatrization of chronic wounds, such as ulcerous lesions in diabetics, varicose ulcers, the esthetic cicatrization of surgical wounds, the preventive and curative treatment

of stretchmarks and complications thereof.

In the above indications, the peptide derivatives can be used in human and veterinary therapy in the form of "ointments, gels, solutions or spray".

5 One of the preferred applications of the invention is the use of peptide derivatives in the various fields of cosmetology, for the preventive and curative treatment of wrinkles on the face, the neck and the hands, in the form of lotions, gels, milks, creams or
10 spray, in local application.

Another application of the peptide derivatives of the invention is their use as activating and potentiating agents for physiological mechanisms of cellular cooperation.

15 The peptide derivatives can be used alone or, preferably, in combination with natural compounds or biomolecules or synthetic derivatives thereof, the specific biological activity of which can only be fully expressed by collaboration between two complementary
20 cellular systems of which they stimulate or induce only one element.

This is the case, in particular, for melanotropic hormones which induce melanogenesis in melanocytes and whose expression at the surface of the human epidermis
25 (white race) can only be fully expressed by intimate cooperation between melanocytes and keratinocytes, thus forming a veritable functional unit known as an "epidermal melanin unit".

Melanocytes activated by α MSH and derivatives
30 thereof secrete melanin, which is transferred and dispersed, in the keratinocytes, under the influence of the peptide factors for cellular cooperation and homologous derivatives thereof.

One of the applications of the present invention
35 is the use of the peptide derivatives described above in the various fields of dermatology and cosmetology.

The peptide derivatives can be used alone or in combination with other active molecules, such as homologous derivatives of α MSH synthesis, or other

substances, in the form of creams, milks, lotions, solutions or sprays, in topical (local) applications, to accelerate the processes of melanogenesis of the epidermis, to accelerate the melanization of the skin by
5 producing a natural tan, and to offer complete protection against solar (UV) radiation.

More particularly, the present invention relates to conjugates containing a peptide sequence comprising at least three amino acids chosen from Lys-Lys-Gly, Gly-His-
10 Lys and Glu-His-Lys, in which "Lys" represents lysine or a halogenated lysine derivative, or a methylated lysine derivative, in particular methyllysine and dihydrobromomethyllysine, it being possible for the amino acids to be in D, L or DL form.

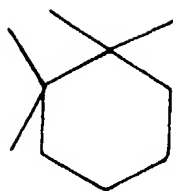
15 These amino acids are in their natural or unnatural form, the said sequence being used in peptide form, or chemically or physically conjugated with at least one compound selected from

1) monocarboxylic acids of general formula
20 HOOC-R (I)

in which R represents a substituted or unsubstituted, straight or branched C_1 to C_{20} aliphatic radical, in particular an alkyl, alkenyl or alkynyl radical which can contain one or more unsaturations and can be substituted
25 with one or more radicals chosen from the group comprising: NH_2 , OH, oxo or a non-aromatic cyclic radical containing 5 or 6 atoms in the ring, it being possible for one or two of these to be other than carbon, in particular S, O or N, it being possible for the said rings to be
30 substituted with C_1 to C_3 alkyl radicals, in particular methyl,

as well as the alcohol or aldehyde or amide derivatives of the acids of formula I:
on condition that if the peptide sequence solely comprises Gly-His-Lys, it is not conjugated to a single
35 palmitic acid residue.

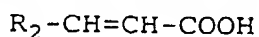
Among the rings which can be substituted, mention should be made of the following



corresponding to retinoic acid derivatives and lipoic acid derivatives.

In certain cases, the aliphatic chain can consist of a polyalkenyl chain.

5 Among the compounds of formula I, mention should preferably be made of the compounds of formula:



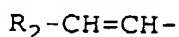
of cis or trans configuration in which R_2 is a C_6 to C_{16} alkyl radical optionally containing one or more $-NH_2$, OH or oxo substituents.

10 2) the dicarboxylic acids of general formula



in which R_1 represents a substituted or unsubstituted, straight or branched, in particular C_3 to C_{10} , divalent aliphatic radical, in particular an alkyl, alkylene, 15 alkenylene or alkynylene radical, which can contain one or more unsaturations and can be substituted with one or more NH_2 , OH or oxo radicals or a C_1 to C_3 alkyl radical.

In the general formula I, mention should be made 20 more particularly of the compounds in which R represents:
- a monounsaturated radical of cis or trans configuration, of general formula



in which R_2 represents a linear or branched aliphatic 25 radical, in particular alkyl, comprising at least six carbon atoms, preferably 6 to 16 carbon atoms, substituted with an amino, hydroxyl or oxo group;

- a linear or branched C_1 - C_{20} alkyl radical optionally substituted with one or more substituents chosen from: 30 amino, hydroxyl, oxo, thiol, imino, C_4 - C_7 cycloalkyl, which is optionally substituted, and if at least two substituents are present, they can together form a bond, in particular a disulfide bridge.

The conjugate peptides according to the invention are linked, in the form of salts, esters or amides, to acids having essential metabolic functions in the activation of the Krebs tricarboxylic cycle.

5 The acids of general formula (I) or (II) are chosen more particularly from the carboxylic acids for which R_1 represents a substituted or unsubstituted C_4 - C_8 alkylene, in particular acetic, adipic and α -aminoadipic acids and derivatives, DL-lipoic acid and derivatives,
10 dihydrolipoic acid and its N-lipoyllysine derivative, pimelic acid and derivatives, and sebacic acid and derivatives.

 The fatty acids for which R represents a linear or branched alkylene residue are more particularly
15 hydroxydecanoic and decenoilic acids, retinoic acids and derivatives thereof, retinal and retinol, myristic acid and derivatives thereof, and palmitic acid, in the form of salts, esters or amides.

 Compounds especially suitable for obtaining
20 conjugates according to the invention are chosen from acetic acid and derivatives thereof, α -DL-lipoic acid and derivatives thereof, dihydrolipoic acid, N-lipoyllysine, adipic acid, α -aminoadipic acid, pimelic acid, sebacic acid and derivatives thereof, trans-10-hydroxy- Δ^2 -
25 decanoic acid and trans-oxo-9-decen-2-oic acid, retinoic acid and derivatives thereof, retinol, retinal, myristic acid and palmitic acid.

 More specifically, the present invention relates to peptides which induce endocellular synthesis of
30 collagens of type I and III and glycosaminoglycans, with high metabolic and cicatrizing activity, as well as molecules for inducing and stimulating processes of cellular cooperation.

 The peptide conjugates according to the invention
35 preferably comprise at least one of the following peptide sequences:

Lys-Lys-Gly

Gly-His-Lys

Glu-His-Lys

in which Lys represents lysine or a halogenated lysine derivative, or a methylated lysine derivative, in particular methyllysine and dihydrobromomethyllysine, it being possible for the amino acids to be in D, L or DL form.

Preferably, the peptide conjugates correspond to one of the following general formulae:

A-X-Gly-His-Lys-Y (III), or

A-X-Glu-His-Lys-Y (IV)

in which A is a compound of general formula I or II or the radical corresponding to this compound

X can represent a chain of 1 to 3 Lys residues, which is optionally methylated, in particular at the N-terminal end, OH, NH₂ or a bond

Y can represent OH or NH₂, the amino acids being in D, L or DL form.

A is preferably acetic acid, adipic acid, α-amino adipic acid, DL-lipoic acid, dihydrolipoic acid, N-lipoyllysine, pimelic acid, sebacic acid, trans-oxo-9-decen-2-oic acid and trans-hydroxy-10-decen-2-oic acid.

The present invention relates particularly to the following peptide conjugates:

- 1- A-MeLys-Lys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂
- 2- A-MeLys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂
- 3- A-MeLys-Gly-His-Lys-NH₂
- 4- A-MeLys-Lys-Lys-Gly-His-Lys-OH
- 5- A-MeLys-Lys-Gly-His-Lys-OH
- 6- A-MeLys-Gly-His-Lys-OH
- 7- A-Lys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂
- 8- A-Lys-Gly-His-Lys-NH₂
- 9- A-Lys-Lys-Gly-His-Lys-OH
- 10- A-Lys-Gly-His-Lys-OH
- 11- A-Lys-Lys-Glu-His-Lys-NH₂
- 12- A-Lys-Glu-His-Lys-NH₂
- 13- A-Glu-His-Lys-NH₂
- 14- A-Lys-Lys-Glu-His-Lys-OH
- 15- A-Lys-Glu-His-Lys-OH

16- A-Glu-His-Lys-OH

A being defined as above, as well as the derivatives of these molecules in the form of salts, esters or amides.

5 The amino acid sequences mentioned above can be sequences of natural or unnatural amino acids.

 The conjugations according to the present invention can be carried out by reacting the amine or acid function of the amino acid with an amine or acid function
10 of the acid A, or it is even possible to exploit the presence of a hydroxyl function on the acid.

 The present invention relates to all of these conjugations, as well as to the nonfunctional conjugates.

 The peptide conjugates described above in the
15 invention can be used in their peptide form or linked with a metal in the form of equimolecular complexes.

 The metal used to prepare the metallopeptide complexes of the invention is preferably a divalent metal, in particular zinc (Zn), which can be coupled in
20 salt form with the carboxylic group of the terminal amino acid, lysine (Lys).

 Similarly, in certain cases, it is possible that certain amino acids contain, for example, glycosylation functions.

25 It should be understood that the present invention also relates to all of these forms.

 According to another aspect, the invention relates to pharmaceutical compositions containing at least one peptide conjugate as defined above, with
30 cosmetologically and/or pharmaceutically acceptable excipients.

 The present invention relates more particularly to the use, as a medicinal product, of one or more of the peptide derivatives and conjugates described above
35 according to the invention.

 The present invention also relates to cosmetic preparations containing one or more peptide derivatives and conjugates described above according to the invention.

The present invention also relates to galenic, pharmaceutical and cosmetological compositions comprising at least one of the compounds as defined above.

5 One of the subjects of the present invention is the use, via the topical or injectable route, of peptide conjugates and of their derivatives, composition or combination with known active principles.

10 These peptide conjugates, their derivatives, composition or combination can be in the form of lyophilized injectable vials or in the form of cream, gels, milks, lotions or sprays, and can contain known excipients.

15 The peptide conjugates of the invention, their derivatives, compositions or combinations with known active principles, are useful for the treatment and cicatrization of chronic lesions or wounds in diabetics, varicose ulcers, the cicatrization of surgical wounds, and the preventive and curative treatment of stretchmarks.

20 The conjugate may, in particular, be combined with at least one substance chosen from antiseptics, antibiotics with a broad antimicrobial spectrum, or antifungal agents with a broad spectrum of activity, for the preparation of a composition intended for the topical treatment and cicatrization of infected wounds.

25 According to another aspect, the peptide conjugate can be in the form of combinations or compounds, with molecules known for their anticoagulant and phlebotomic activities via the topical route, which are intended for the preventive and curative treatment of stretchmarks, venal insufficiency (tired legs) and blotches, in local application, in the form of creams, gels, milks or sprays.

30 One of the preferred applications of the invention is the use of the peptide conjugates as adjuvants, activators or cofactors, in combination with molecules chosen from α MSH or homologous derivatives thereof, ACTH or proopiomelanocortin and analogs thereof, in compositions intended for the preventive and curative treatment

of melanogenesis disorders, for the stimulation of epidermal melanogenesis, in order to obtain a rapid natural tan and for total protection against ultraviolet solar radiation (DEM).

5 Another of the preferred applications of the invention is the use of the peptide conjugates in various cosmetological formulations for the preventive and curative treatment of wrinkles on the face, the neck and the hands, in the form of emulsions, creams, milks,
10 lotions, gels or sprays, in local application.

The examples which follow are intended to illustrate the invention without limiting its scope in any way.

15 In these examples, reference will be made to the following figures:

Figure 1: Intensity of fluorescence of fibroblasts labelled with rhodamine: demonstration of type-I collagen.

20 Figures 2 and 3: Demonstration, by measuring the intensity of coloration, of collagen synthesis by cells which are or are not treated with conjugate No. 7.

Example No. 1 - Synthesis of conjugate 7

A-Lys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂

A = adipic acid = COOH-(CH₂)₄-COOH

25 The synthesis was carried out by the Merrifield method adapted to the structure of the conjugate according to the following steps:

Z-Gly-His-Lys-NH₂:

30 H-His-Lys-NH₂ hydrochloride (2.1 g, 11 mmol) is added, with stirring and at 0°C, to a solution in dimethylformamide (10 ml) containing Z-Gly-OH (2.08 g, 10 mmol), BOP (4.42 g, 10 mmol) and diisopropylethylamine (DIEA, 22 mmol).

35 After stirring for 6 hours at room temperature, the reaction solvent is evaporated off under vacuum at a

temperature below 40°C.

The residue is dissolved in ethyl acetate (200 ml).

5 The organic phase is washed several times with saturated sodium bicarbonate solution (2 x 50 ml), with water (2 x 50 ml), with saturated KHSO₄ solution (2 x 50 ml) and with water (2 x 50 ml).

The organic phase is dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum to give a homogeneous white
10 foam (3.1 g, 91%) after chromatography on silica gel.

Z-Lys-(Boc)-Gly-His-Lys-NH₂

The compound Z-Gly-His-Lys-NH₂ (3.45 g, 10 mmol) is dissolved in 95 ethanol (100 ml) containing 20 mmol of hydrochloric acid.

15 The reaction mixture is hydrogenated for 5 hours.

The catalyst is filtered off and the solvent is concentrated under vacuum at a temperature below 40°C.

The remaining residue is triturated several times from ether and decanted. It is dried under vacuum in the
20 presence of KOH. This residue is dissolved in dimethylformamide (10 ml) in the presence of Z-Lys-(Boc)-OH (3.81 g, 10 mmol), BOP (4.42 g, 10 mmol) and diisopropylethylamine (DIEA, 22 mmol).

The reaction mixture is stirred for 30 min at 0°C
25 and then for four hours at room temperature.

The reaction solvent is evaporated off under vacuum at a temperature below 40°C.

The residue is dissolved in ethyl acetate (200 ml).

30 The organic phase is washed several times with saturated sodium bicarbonate solution (2 x 50 ml), with water (2 x 50 ml), with saturated KHSO₄ solution (2 x 50 ml) and with water (2 x 50 ml). The organic phase is dried over sodium sulfate and concentrated under
35 vacuum to give a homogeneous white foam (4.7 g, 82%) after chromatography on silica gel.

Z-Lys-(Boc)-Lys-(Boc)-Gly-His-Lys-NH₂

The compound Z-Lys-(Boc)-Gly-His-Lys-NH₂ (5.7 g, 10 mmol) is dissolved in 95 ethanol (150 ml) containing 10 mmol of hydrochloric acid.

The reaction mixture is hydrogenated for 5 hours.

5 The catalyst is filtered off and the solvent is concentrated under vacuum at a temperature below 40°C.

 The remaining residue is triturated several times from ether and decanted. It is dried under vacuum in the presence of KOH. This residue is dissolved in dimethyl-
10 formamide (10 ml) in the presence of Z-Lys-(Boc)-OH (3.81 g, 10 mmol), BOP (4.42 g, 10 mmol) and diisopropylethylamine (DIEA, 22 mmol).

 The reaction mixture is stirred for 30 min at 0°C and then for six hours at room temperature.

15 The reaction solvent is evaporated off under vacuum at a temperature below 40°C.

 The residue is dissolved in ethyl acetate (300 ml).

 The organic phase is washed several times with
20 saturated sodium bicarbonate solution (2 x 50 ml), with water (2 x 50 ml), with saturated KHSO₄ solution (2 x 50 ml) and with water (2 x 50 ml). The organic phase is dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum to give a homogeneous white foam (6.5 g, 81%)
25 after chromatography on silica gel.

 A-Lys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂

 The compound Z-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Gly-His-Lys-NH₂ (8 g, 10 mmol) is dissolved in 95 ethanol (200 ml) containing 20 mmol of hydrochloric acid.

30 The reaction mixture is hydrogenated for 5 hours.

 The catalyst is filtered off and the solvent is concentrated under vacuum at a temperature below 40°C.

 The remaining residue is triturated several times from decanted ether. It is dried under vacuum in the
35 presence of KOH. This residue is dissolved in dimethyl-formamide (10 ml) in the presence of adipic acid (2.1 g, 10 mmol), BOP (4.42 g, 10 mmol) and diisopropylethylamine (DIEA, 22 mmol).

 The reaction mixture is stirred for 15 min at 0°C

and then for five hours at room temperature.

The reaction solvent is evaporated off under vacuum at a temperature below 40°C.

5 The residue is dissolved in ethyl acetate (200 ml).

The organic phase is washed several times with saturated sodium bicarbonate solution (2 x 50 ml), with water (2 x 50 ml), with saturated KHSO₄ solution (2 x 50 ml) and with water (2 x 50 ml). The organic phase
10 is dried over sodium sulfate and concentrated under vacuum to give a homogeneous white powder (7.5 g, 76%) after chromatography on silica gel.

This compound is dissolved in trifluoroacetic acid (50 ml).

15 After 30 min, the solvent is concentrated under vacuum at a temperature below 40°C and the residue is triturated several times from anhydrous ether.

The white powder obtained (6.9 g, 88%) is dried under vacuum.

20 Adipoyl-Lys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂

Example No. 2 - Synthesis of conjugate 8

A-Lys-Gly-His-Lys-NH₂

A = trans-10-hydroxydec-2-enoic acid

25 The synthesis was carried out by the Merrifield method adapted according to the following steps and the methodology described in Example No. 1:

- 1- Z-Gly-OH + H-His-Lys-NH₂
- 2- Z-Gly-His-Lys-NH₂
- 3- Z-Lys-(BOC)-Gly-His-Lys-NH₂
- 30 4- A-BOP, DIEA, DMF
- 5- Decenoyl-Lys-Gly-His-Lys-NH₂

Preparation of the metallopeptide complex with zinc.

The zinc salt used is in the form of ZnCl₂.

35 The peptide conjugate obtained above is dissolved

in distilled water at pH 5.6 in the following proportions:

1 molecule of conjugate No. 8 in 10% ZnCl_2 solution.

5 After heating at 20°C for 10 min, the complex is purified on a column of Biogel P-2 in order to remove the excess zinc chloride not bound to the peptide, and is eluted with distilled water.

10 After elution, a solution containing 0.5% of ZnCl_2 per peptide molecule is obtained.

The solution is then frozen at low temperature "-60°C" and lyophilized.

The metallopeptide complex is obtained in the form of a white powder whose formula is as follows:

15 $\text{HO}(\text{CH}_2)_7\text{-CH=CH-CO-Lys-Gly-His-Lys-Zn}$
or (trans-10-hydroxydec-2-enoic-Lys-Gly-His-Lys-Zn)

whose analytical properties are as follows:

Organoleptic properties: White, water-soluble lyophilisate

20 HPLC purity: 95%

"Zinc-free" mass spectrometry MW 636.46363.6

Amino acid composition

(% zinc-free)

Lysine	42.95%
25 Histidine	21.55%
Glycine	8.97%

Example 3 - Study of the cicatrizing power of peptide conjugate No. 7 in animals (rats)

Aim of the study

30 To determine the cicatrizing power of peptide No. 7 administered to OFA rats by topical application at doses of 0.75 µg, 7.5 µg and 75 µg per animal for five days.

Materials and method

I- Animals: rats of OFA strain, OF1, IFFA-CREDO, weighing 250 to 300 g.

II- Test products

5 Peptide conjugate No. 7, corresponding to the formula:

Adipoyl-Lys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂.

Dissolved in propylene glycol at doses of 1.5 µg/ml, 15 µg/ml and 150 µg/ml.

10 III- Method

After general anesthesia with ether, an incision 5 cm in length was made on the right flank of the animals.

15 Suturing with trinyl 2/0 thread was carried out at a level of one stitch every 0.5 cm.

The animals treated as the controls underwent the same operation under the same conditions.

20 The treatment began the day after the operation on the batches of animals treated with doses of 0.5 ml of peptide solution on each incision i.e. 0.75 µg, 7.5 µg and 75 µg of peptide per animal and per application for the duration of the treatment, i.e. five days.

25 The animals were placed under observation for nine days and were then sacrificed by means of a lethal dose of penthiobarbital.

The zones of skin in the course of cicatrization were removed and subjected to "drawing" tests with a dynamometer, in order to measure the resistance of the scar to drawing.

30 Statistical analysis of the results

A statistical analysis was carried out on the resistance values obtained by dynamometer.

A variance analysis and a student "T" test were carried out on the individual values in order to define

the significance threshold of the results.

Results

Peptide No. 7, administered at doses of 0.75 µg, 7.5 µg and 75 µg per day and for five consecutive days to the experimental animals, significantly increases the cicatrization of wounds in the treated animals relative to the controls, at doses of:

0.75 µg, the increase is 14.5%,
7.5 µg, the increase is 30.9%,
75 µg, the increase is 59.6%.

In particular, total cicatrization is observed in the treated animals, from the 3rd day, whereas the controls show no visible signs of cicatrization.

The appearance of the cicatrizations on the 9th day in the treated animals shows a perfectly flat scar with the absence of scar folds.

Table No. 1

Animals treated with 0.75 µg/day/5 days with peptide formula No. 7

Resistance of the scars to "dynamometric" drawing

Control group		Treated group	
Animals	Dynes	Animals	Dynes
894923	26.2	894918	28.5
894924	23.7	894919	26.1
894925	22.5	894920	29.3
894926	25.4	894921	27.7
894927	24.8	894922	28.6
Average	24.5+/- 1.5	Average	28.0 +/- 1.2

Table No. 2

Animals treated with 7.5 µg/day/5 days with peptide formula No. 7

5	Control group		Treated group	
	Animals	Dynes	Animals	Dynes
	894923	26.2	894928	32.6
	894924	23.7	894929	30.4
	894925	22.5	894930	33.1
	894926	25.4	894931	32.3
10	894927	24.8	894932	31.8
	Average	24.5 +/- 1.5	Average	32.0 +/- 1.0

Table No. 3

Animals treated with 7.5 µg/day/5 days with peptide formula No. 7

15	Control group		Treated group	
	Animals	Dynes	Animals	Dynes
	894923	26.2	894933	39.8
	894924	23.7	894934	41.3
	894925	22.5	894935	37.5
20	894926	25.4	894936	36.2
	894927	24.8	894937	40.7
	Average	24.5 +/- 1.5	Average	39.1 +/- 2.2

Conclusions

The results obtained in this study make it possible to conclude that peptide No. 7 has a highly significant cicatrizing action.

For the doses of 75 µg per day for five days, the difference between the treated group and the control group is 59.6%.

Example 4 - Demonstration of the activity of conjugate No. 7 on the synthesis of type-I collagen for fibroblasts under culture

The demonstration of the influence of conjugate No. 7 on the synthesis of type-I collagen by cells under culture was carried out on two cell types:

- human mammary plastic fibroblasts at the 3rd passage, obtained in our cell culture laboratory at the IEB,
- MRC5s, non-transformed human embryonic lung fibroblasts at the p38 passage, obtained at p25-30 from ICN Flow.

The cells are or are not stimulated with conjugate No. 7 and are then observed under a fluorescence photon microscope after revealing the type-I collagen by a secondary immunofluorescence reaction.

Materials and method

Cell culture:

The cells are inoculated at a rate of 70,000 cells per ml for the primary-culture fibroblasts and 20,000 for the MRC5s.

The culturing is performed in 10% DMEM FCS in Leighton tubes containing a lamella at the bottom of the tube, final volume: 1.6 ml.

8 tubes are provided per cell type: 3 controls and 5 concentrations.

Preparation of the products:

Preparation of a stock solution of conjugate No. 7 at 2.34×10^{-3} M:M1

	M	Vol. of M	Vol. of PBS-BSA	Vol. M
30	M2	2 ml M1	2.68 ml	10^{-3} M

M3	0.01 ml M2	1 ml	10^{-5} M
M4	0.01 ml M3	1 ml	10^{-7} M
M5	0.01 ml M4	1 ml	10^{-9} M

These various stock solutions are added to the culture medium at the time of product contact.

The dilutions are made in PBS (Eurobio) - 0.1% BSA (Flucka) and then filtered on 0.22 μ m filters (Sartorius).

Methodology

At D0, the medium is removed and replaced by fresh medium to which is added conjugate No. 7 at various concentrations according to the following table:

C	Final concentration	Vol. medium	Vol. M
C1	10^{-4} M	1.5 ml	0.15 ml M2
C2	10^{-5} M	1.5 ml	0.015 ml M2
C3	10^{-7} M	1.5 ml	0.015 ml M3
C4	10^{-9} M	1.5 ml	0.015 ml M4
C5	10^{-7} M	1.5 ml	0.015 ml M5

The controls T0 and T receive only medium.
T1 is treated as C1.

Fixing the cells

The medium is removed; the tubes are rinsed three times with serum-free DMEM at 37°C.

The cells are fixed for 20 min at 4°C in the presence of 2.5% PFA (Prolabo) in Hanks (Eurobio).

Three rinses with serum-free DMEM are carried out, followed by two washes for 10 min with PBS free of calcium and magnesium (Eurobio).

Labeling the cells

* Primary reaction: binding of the first anti(type-I human collagen) mouse antibody diluted to 1/100 in PBS.

5 The lamellae are removed from the tubes and dried. The side carrying the cells is detected and indicated (the corner is broken off to act as a reference point).

10 100 ml of primary antibodies are placed in contact with the cells for the conditions C1 to C5.

 The lamellae T and T1 remain in the tubes with PBS without calcium or magnesium since they are controls for the second antibody.

15 The lamellae are placed in a humid chamber, to prevent dehydration, at +4°C with gentle agitation overnight.

* Secondary reaction: this step reveals the primary reaction by means of a TRITC-labeled anti(mouse IgG) goat secondary antibody: Sigma rf. T-7782 batch 044H4831.

20 The primary antibody is removed and the lamellae are washed twice with PBS for 10 min at room temperature.

 A wash with 0.1% BSA PBS is carried out for a further 10 min.

25 100 ml of secondary antibody diluted to 1/120 are placed in contact with the cells of all the lamellae at room temperature for 1 hour.

 The antibody is then removed and the lamellae are washed with 0.1% BSA PBS for 10 min and then 4 x 5 min with osmosed water.

30 After they have dried, the lamellae are mounted, cell-side upward, onto a microscope slide against a drop of mounting liquid (Sigma). The edges of the lamellae are sealed with varnish.

Results

35 The microscope observations are carried out under a Zeiss (Axioplan) straight fluorescence microscope

mounted with a Sony 3 CCD camera (MC-3215 P/M) connected
to a Trinitron video monitor with a Sony color screen.
The assembly is connected to a Sony color printer
(UP-7000p). The slides are observed using a Plan A
5 apochromat x 63 objective with oil.

The cells are first observed under interference
contrast and/or phase contrast. When a field is selected,
the image is recorded and then, without moving position,
the observation is carried out by fluorescence and
10 recorded..

Thus, for each view taken, the two memorized
images are simultaneously available on the screen or are
superimposed.

Conclusions

15 As shown by this set of results, conjugate No. 7
at 10-11 M very significantly stimulates the synthesis of
type-I collagen by primary-culture fibroblasts.

The red color indicates binding of the rhodamine-
labeled secondary antibodies to the anti(type-I collagen)
20 antibodies. This color thus bears witness to the presence
of type-I collagen synthesized by the fibroblasts in
culture.

The average red luminosity on the entire image of
the cells treated with conjugate No. 7 at 10-11 M is
25 54.8, whereas for the untreated cells it is only 32.78.

Conjugate No. 7 significantly stimulates the
synthesis of type-I collagen by primary-culture human
fibroblasts: +67%.





The results not presented here, obtained on the
30 MRC5s, give the same tendencies.

(See Figures 1 to 3).

KEY TO THE FIGURES

Figure 1:

Fluorescence intensity of rhodamine-labeled fibroblasts:
demonstration of type-I collagen

- 5  10-11 M
-  10-9 M
-  10-7 M
-  T

CLAIMS

1. Peptide conjugate, characterized in that it comprises a sequence of at least three amino acids chosen from Lys-Lys-Gly, Gly-His-Lys and Glu-His-Lys,
5 in which "Lys" represents lysine or a halogenated lysine derivative, or a methylated lysine derivative, in particular methyllysine and dihydrobromomethyllysine, it being possible for the amino acids to be in D, L or DL form,
10 the said sequence being chemically or physically conjugated with at least one compound selected from
- monocarboxylic acids of general formula
$$\text{HOOC-R} \quad (\text{I})$$

in which R represents an optionally substituted, linear
15 or branched $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ aliphatic radical which can contain one or more unsaturations,
as well as the alcohol or aldehyde or amide derivatives of the acids of formula I; on condition that if the peptide sequence solely comprises Gly-His-Lys, it is not
20 conjugated to a single palmitic acid residue;
- the dicarboxylic acids of general formula
$$\text{HOOC-R}_1\text{-COOH} \quad (\text{II})$$

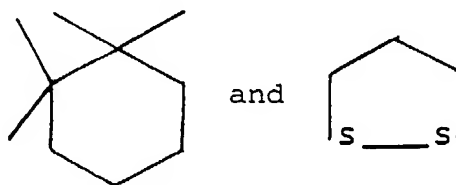
in which R_1 represents a straight or branched divalent aliphatic radical comprising at least 3 carbon atoms,
25 preferably 3 to 10 carbon atoms, in particular an alkyl, alkylene, alkenylene or alkynylene radical, which can contain one or more unsaturations, and which is optionally substituted, in particular with one or more amino, hydroxyl or oxo groups or a $\text{C}_1\text{-C}_3$ alkyl radical.
- 30 2. Conjugate according to Claim 1, characterized in that, in the general formula I, R can represent:
- a monounsaturated radical of cis or trans configuration, of general formula
$$\text{R}_2\text{-CH=CH-}$$

35 in which R_2 can represent a linear or branched alkyl radical comprising at least six carbon atoms, preferably 6 to 16 carbon atoms, optionally substituted with an amino, hydroxyl or oxo group;

- a substituted or unsubstituted, linear or branched C_1 - C_{20} aliphatic radical, in particular an alkyl, alkenyl or alkynyl radical which can contain one or more unsaturations and can be substituted with one or more radicals
5 chosen from the group comprising:

NH_2 , OH, oxo, thiol or a non-aromatic cyclic radical containing 5 or 6 carbon atoms in the ring, 1 or 2 of which can be other than carbon, in particular S, O or N, it being possible for the said rings to be substituted
10 with C_1 to C_3 alkyl radicals, in particular methyl.

3. Conjugate according to Claim 2, characterized in that when R represents a C_1 - C_{20} aliphatic chain, it can be substituted with a ring chosen from



15 4. Conjugate according to Claim 1, characterized in that, in formula II, R_1 represents an optionally substituted C_4 - C_8 alkylene residue.

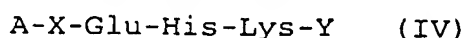
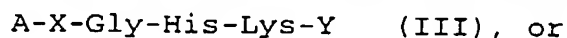
5. Conjugate according to one of Claims 1 to 4, characterized in that the amino acid sequence is linked
20 to the acid of formula I or II or to its derivative in the form of salt, ester or amide.

6. Conjugate according to one of Claims 1 to 4, characterized in that the acid of general formula I is chosen from acetic acid, DL-lipoic acid, dihydrolipoic acid, N-lipoyllysine, hydroxydecenoic and decenoic acids, retinoic acid and derivatives thereof, retinal and retinol, myristic acid and derivatives thereof, and palmitic acid, in the form of salts, esters or amides, and in that the acid of general formula II is chosen from
25 adipic acid, α -aminoadipic acid, pimelic acid and sebacic acid, and derivatives thereof.

7. Conjugate according to one of Claims 1 to 6, characterized in that the acids of general formula I or II are preferably chosen from acetic acid and derivatives thereof, α -DL-lipoic acid and derivatives thereof,
35

dihydrolipoic acid, N-lipoyllysine, adipic acid, α -amino-adipic acid, pimelic acid, sebacic acid and derivatives thereof, trans-10-hydroxy- Δ^2 -decenoic acid and trans-oxo-9-decen-2-oic acid, retinoic acid and derivatives thereof, retinol, retinal, myristic acid and palmitic acid.

8. Conjugate according to one of Claims 1 to 7, characterized in that it has the general formula



10 in which A is a compound of general formula I or II or the corresponding radical

X can represent a chain of 1 to 3 Lys residues, which are optionally methylated, OH, NH₂ or a bond

15 Y can represent OH or NH₂,

the amino acids being in D, L or DL form.

9. Conjugate according to one of Claims 1 to 8, characterized in that it is selected from the following peptide derivatives:

- 20 1- A-MeLys-Lys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂
- 2- A-MeLys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂
- 3- A-MeLys-Gly-His-Lys-NH₂
- 4- A-MeLys-Lys-Lys-Gly-His-Lys-OH
- 5- A-MeLys-Lys-Gly-His-Lys-OH
- 25 6- A-MeLys-Gly-His-Lys-OH
- 7- A-Lys-Lys-Gly-His-Lys-NH₂
- 8- A-Lys-Gly-His-Lys-NH₂
- 9- A-Lys-Lys-Gly-His-Lys-OH
- 10- A-Lys-Gly-His-Lys-OH
- 30 11- A-Lys-Lys-Glu-His-Lys-NH₂
- 12- A-Lys-Glu-His-Lys-NH₂
- 13- A-Glu-His-Lys-NH₂
- 14- A-Lys-Lys-Glu-His-Lys-OH
- 15- A-Lys-Glu-His-Lys-OH
- 35 16- A-Glu-His-Lys-OH

"A" being an acid of general formula I or II as defined in Claims 1 to 7, as well as the derivatives of these molecules in the form of salts, esters or amides.

10. Conjugate according to one of Claims 1 to 9, characterized in that it is in the form of metallopeptide complexes physically or chemically linked to a zinc salt.

11. Pharmaceutical composition, characterized in that
5 it contains at least one conjugate according to one of Claims 1 to 10 with pharmaceutically acceptable excipients.

12. Galenic pharmaceutical composition comprising at least one of the peptide conjugates according to one of
10 Claims 1 to 10, in the form of ointments, dermal creams, gels, lotions and sprays, intended for human and veterinary medicine for the treatment and cicatrization of wounds.

13. Galenic pharmaceutical composition comprising at
15 least one peptide conjugate according to one of Claims 1 to 10, characterized in that the conjugate is combined with at least one substance chosen from antiseptics, antibiotics with a broad antimicrobial spectrum, or antifungal agents with a broad spectrum of activity,
20 which is intended for the topical treatment and cicatrization of infected wounds.

14. Galenic composition for pharmaceutical and cosmetological use, comprising at least one of the peptide conjugates according to Claims 1 to 10, in the
25 form of combinations or compounds, with molecules known for their anticoagulant and phlebotomic activities via the topical route, which are intended for the preventive and curative treatment of stretchmarks, venal insufficiency (tired legs) and blotches, in local appli-
30 cation, in the form of creams, gels, milks or sprays.

15. Galenic composition for pharmaceutical and cosmetological use, comprising at least one of the peptide conjugates according to Claims 1 to 10, used
alone, or in the form of combinations, of compounds, or
35 of complexes, with molecules known for their homologous derivatives of α MSH, of ACTH, and of proopiomelanocortin, which are in the form of creams, gels, milks, lotions or sprays, for topical application, and intended for the preventive and curative treatment of melanogenesis

disorders, for the acceleration of epidermal melanization, for obtaining a natural skin tan, and for total protection against ultraviolet (UVA-UVB) solar radiation.

- 5 16. Peptide conjugate according to one of Claims 1 to 10, for its use as a medicinal product.
- 10 17. Cosmetological composition containing at least one conjugate according to one of Claims 1 to 10, in the form of creams, gels, lotions or sprays, for topical application, which are intended for the preventive and curative treatment of wrinkles on the face, the neck and the hands.

1 / 3

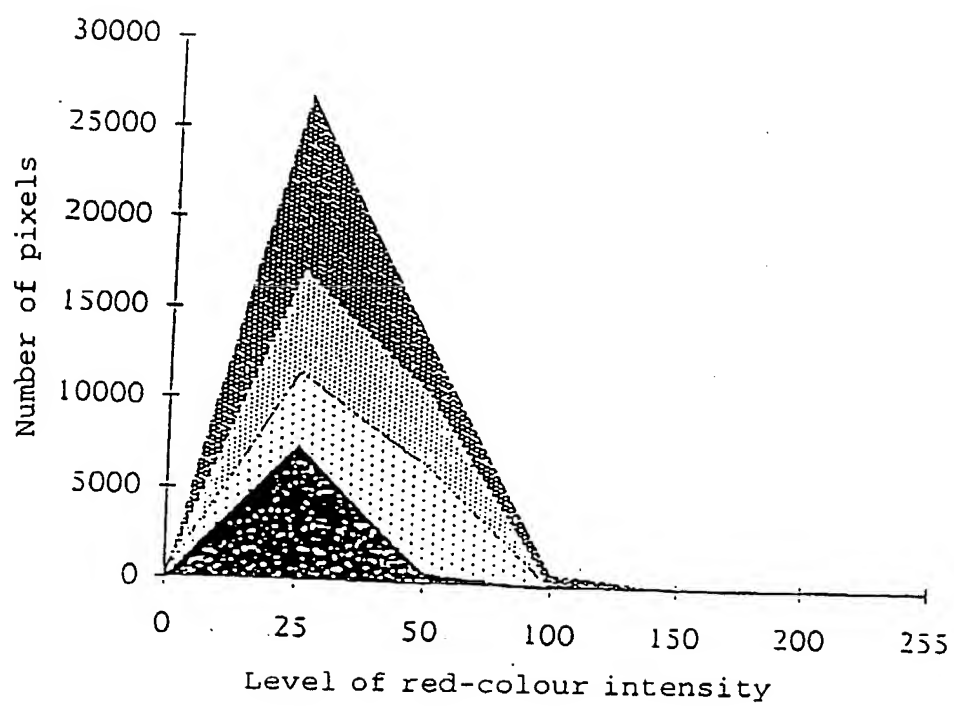
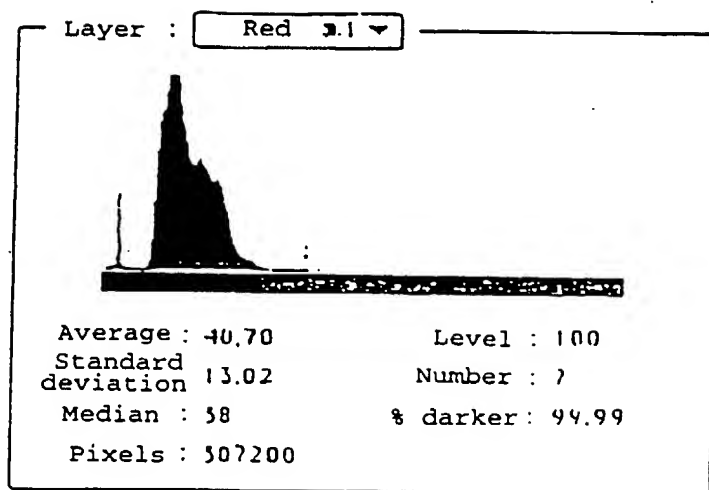
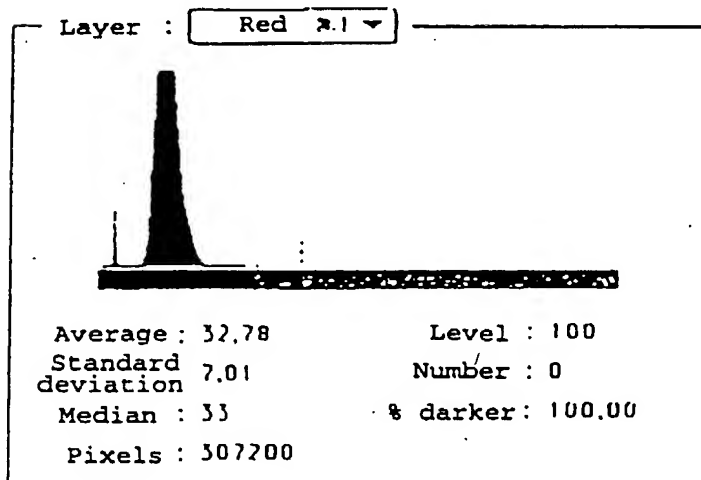
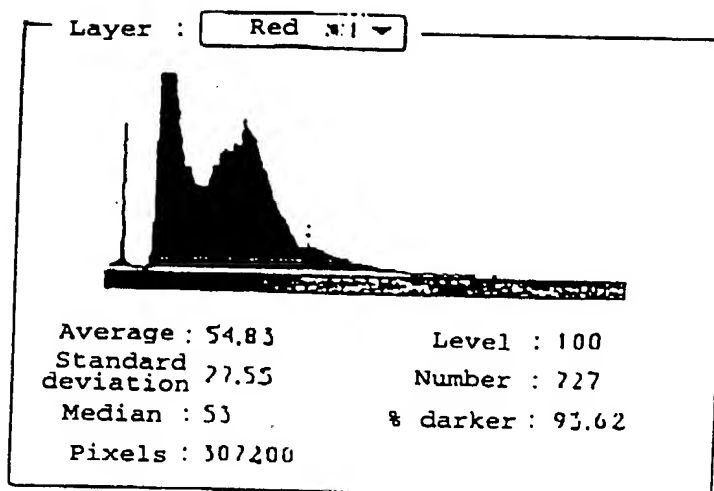
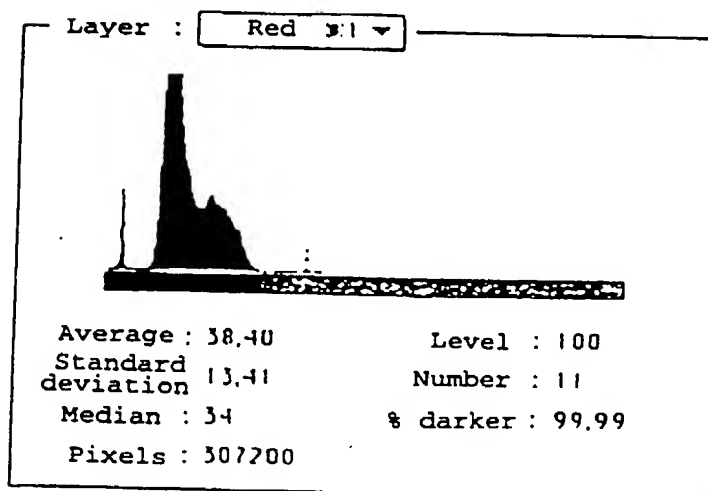


FIG. 1

2/3

FIG. 2AFIG. 2B

3/3

FIG. 3AFIG. 3B